

**SÄULENCHROMATOGRAPHISCHE UND
DISKELEKTROPHORETISCHE AUFTRENNUNGEN
VON NORMAL-SEKRETEN MENSCHLICHER
OHRSPICHELDRÜSEN UND SUBMANDIBULARDRÜSEN
SOWIE ANWENDUNGEN VON EIWEISS-SPEZIAL-
FÄRBUNGEN MIT AUSWERTUNG**

Christian Wondrak

1978



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554611_0058

Aus der Hals-Nasen-Ohren-Klinik
der Universität München
Direktor: Professor Dr. H. H. Naumann

SAULENCHROMATOGRAPHISCHE UND DISKELEKTROPHO-
RETISCHE AUFTRENNUNGEN VON NORMAL-SEKRETEN
MENSCHLICHER OHRSPEICHELDRÜSEN UND SUBMANDI-
BULARDRÜSEN SOWIE ANWENDUNGEN VON EIWEISS-
SPEZIALFÄRBUNGEN MIT AUSWERTUNG

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der Zahn-
Medizin an der Ludwig Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt
von
Christian Wondrak
aus
München

1977



Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin
der Universität München

Berichterstatter:

Priv. Doz. Dr. H. Eichner

Mitberichterstatter:

Professor Dr. H. H. Naumann

Dekan:

Professor Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung:

17.1.1978

I) Einleitung

II) Theoretischer Teil

a) Diskelektrophoretische Auftrennung

- 1) Theorie der Diskelektrophorese nach Maurer
- 2) Polyacrylamid - Gel - System
- 3) Puffersystem

b) Säulenchromatographische Auftrennung

- 1) Gelchromatographie
 - a) Hydrophile Gelherstellung
 - b) Organophile Gelherstellung
 - c) Handelsübliche Gelherstellung

III) Experimenteller Teil:

a) Diskelektrophoretische Auftrennung von
Normalsekreten

1) Durchführung: Gelherstellung

Puffersystem

Apparaturen

Färbungen

2) Ergebnisse: a) Parotissekret

b) Submandibularissekret

b) Säulenchromatographische Auftrennung mit
anschließender diskelektrophoretischer Auf-
trennung

1) Durchführung: Geräte

Versuchsaufbau

Versuchsablauf

Diskelektrophorese

Färbung

2) Ergebnisse: a) Parotissekretfraktionen

b) Submandibularisfraktionen

IV) Gesamtdiskussion

V) Zusammenfassung

Einleitung:

Die menschlichen Kopfspeicheldrüsen haben sowohl wichtige Funktionen im Rahmen der Verdauung, als auch als Ausscheidungsorgane von Abbaustoffen, Blutgruppenfaktoren und im Rahmen der Infektionsabwehr. Diese oberflächlich gelegenen Organe sind noch nicht so gründlich erforscht, wie z.B. die Leber oder Pankreas etc. Die Glandula Parotis ist in der Zusammensetzung ihres Sekretes und deren Veränderung bei Ruhe- und Reizbedingungen bei Normalpersonen schon in einer Anzahl von Arbeiten untersucht worden (Rauch, Benedikt-Spät, Dawes etc.). Untersuchte Parameter waren Flußrate, Elektrolyt- und Eiweißgehalt. Unter physiologischen Bedingungen hängt die Sekretzusammensetzung von der Circadianrhythmik (Dawes, Ferguson etc.) und der psychischen Stimmungslage (Brown) ab.

Elektrophoretische Auftrennungen des Parotissekretes wurden bisher schon an Normalprobanden vorgenommen, in den letzten Jahren vor allem mit Hilfe der Papier- und Zelloseacetatfolienelektrophorese (Zippel). In der Zwischenzeit hat sich die Acrylamidgelelektrophorese als geeignetste Methode für diese Untersuchungen herausgestellt (Steiner, Mayo, Smith).

Im Rahmen einer Untersuchungsreihe der diskelektrophoretischen Auftrennung von Sekreten der großen Kopfspeichel-

drüsen, traten verschiedene Fragen auf, um eine diagnostische Auswertbarkeit voranzubringen.

Die diskelektrophoretische Auftrennung des Sekretes, sowohl des Sekretes der Glandula parotis, als auch der Glandula submandibularis, und die anschließende Anfärbung der Banden, ergibt bestimmte Bandenmuster. Diese weisen eine Ruhe- Reiz- Abhängigkeit auf und verändern sich sowohl bei tumorösen Veränderungen, als auch bei akuten und chronischen Entzündungen. Die Identifizierung der einzelnen, sich ändernden und konstantbleibenden Banden, stand nun an. Eine grobe Einteilung wurde durch Spezialfärbung erreicht. Die Glycoproteinfärbung (nach Caldwell und Pigman, Clarke, Keyser und Zacharius) und die Phosphoproteinfärbung (nach Cutting und Roth) machten die Bandenbereiche der Glyco- und Phosphoproteine sichtbar. Auch immunelektrophoretische Verfahren wurden zur Bandenidentifizierung angewandt. Eine Charakterisierung und Isolierung der Banden mit Hilfe der Gelchromatographie bot sich an. Hierdurch erreicht man eine grobe Zuordnung der einzelnen Banden gemäß dem Molekulargewicht. Diese dient sowohl zur Verifizierung schon bekannter, als auch als Ausgangspunkt noch nicht charakterisierter Eiweißfraktionen.

Theorie der Diskelektrophorese nach Maurer:

Das Kennzeichen der Diskelektrophorese ist ein diskonti-

nuierliches Trennsystem, bezogen auf den pH-Wert, die Pufferzusammensetzung und die Gelporengröße. Die Tatsache, daß am Beginn der Auftrennung sehr schmale, hochkonzentrierte Startzonen des aufgetragenen Materials entstehen, die für die Schärfe der Trennung entscheidend sind, erklärt den wesentlichen Vorteil dieser Diskontinuitäten. Das hohe Auflösungsvermögen wird durch zwei physikalische Effekte bedingt:

1. Der Konzentrierungseffekt, der bewirkt, daß die Substanzen vor ihrer Trennung zu einer scharf begrenzten Zone konzentriert werden. Dies wird dadurch erreicht, daß Puffer und Trenngel einen voneinander abweichenden pH-Wert besitzen.
2. Der Molekurlarsiebeffekt, der dazu führt, daß die gelösten Proteine der aufgebrachten Proben nicht nur nach ihrer elektrischen Gesamtladung beim herrschenden pH-Wert, sondern auch nach ihrem Molekulargewicht und ihrer Tertiärstruktur getrennt werden. Der Reibungswiderstand der einzelnen Moleküle wird bei fester Porengröße des Trenngels durch die Molekulargröße und -form festgelegt. Für die Speichelproteinauftrennung fand ein mittelporiges, 7,5%iges Polyacrylamidgel mit einem pH-Wert von 8,9 Verwendung. Das Auflösungsvermögen konnte auch nicht durch die Erhöhung der

Diskontinuität im Gelsystem unter Verwendung eines großporigen Sammelgels und eines einporigen Trenngels verbessert werden.

Bildung und Struktur des Polyacrylamidgels:

Die Art des verwendeten Systems ist entscheidend für die Wahl des Trenngels in Zusammensetzung und pH-Wert. Hier wurde im anionischen System gearbeitet, in dem negativ geladene Proteinmoleküle in Richtung auf die Anode durch das Gel wandern. Das Polyacrylamid-Gel ist das Polymerisations- und Vernetzungsprodukt von Acrylsäureamid und dem Vernetzer N, N'-Methylenbisacrylamid. Bei dieser Reaktion entsteht ein Geflecht aus Polyacrylamidketten, die untereinander mit Hilfe des Bisacrylamids vernetzen. Der Grad der Polymerisation und Vernetzung legt die Viskosität, Elastizität und Festigkeit des Gels fest. Die Geldichte kann auch als mittlere Porengröße ausgedrückt werden. Verwendet man 7,5%iges Gel, ergibt sich eine mittlere Porengröße von $50 \text{ \AA}$. Diese Zusammensetzung des Gels garantiert eine optimale Auftrennung von Proteingemischen im Molekulargewichtsbereich von $10^4 - 10^6$ und ist somit besonders gut für die Speichelproteinauftrennung geeignet. In diesem Fall werden die beiden Stoffe Ammoniumperoxodisulfat und N,N,N', N'-Tetramethyläthylendiamin (Temed) als Polymerisationskatalysatoren verwendet. Es handelt sich

hierbei um Katalysator-Redoxsysteme, die freie Radikale liefern.

Puffersystem:

Ausschlaggebend für die Wahl des Elektrolytpuffers ist der pH-Wert des Trenngels und der pH-Wert der Substanz. Zum einen muß die Löslichkeit und die chemische und biologische Stabilität der Substanz erhalten bleiben, zum anderen muß der pH-Wert des Elektrodenpuffers in etwa mit dem pH-Wert des Trenngelpuffers übereinstimmen. Die geforderten Bedingungen werden von dem Tris-Glycin-Puffer mit einem pH-Wert von 8,3 erfüllt.

Gelchromatographie:

Folgende Bedingungen muß ein Gel erfüllen, das für die Gelchromatographie geeignet ist:

- 1.) Variable Porengröße des Gels
- 2.) Der Gelbildner darf keine ionisierbaren Gruppen besitzen
- 3.) Die Affinität zu der Trennsubstanz soll gering sein
- 4.) Kleine Körnung für schnelle Einstellung des Diffusionsgleichgewichtes
- 5.) Geringer Strömungswiderstand

Um die Bedingungen 4.) und 5.) gleichzeitig zu erfüllen, ist es erforderlich, daß die Partikel des Gels kugelförmig sind. Die Gelpartikel dürfen nicht zu weich sein, um eine sinnvolle Strömungsgeschwindigkeit zu bekommen. Zwei Wege zur Herstellung derartiger Gele stehen uns zur Verfügung:

Einmal geht man von gelösten Makromolekülen aus und macht sie durch Umsetzen mit bifunktionellen Reagentien unlöslich, das anderemal löst man ein Gemisch von geeigneten mono- und bifunktionellen Monomeren und leitet eine Copolymerisation ein.

Beide Male erhalten wir ein Gel, dessen Porosität von der Gesamtkonzentration und der Menge der bifunktionellen Gruppen abhängt.

Hydrophile Gele:

1. Dextrangele:

Dextran ist ein hochpolymeres Kohlenhydrat, das mit Hilfe des Bakteriums *Leuconostoc mesenteroides* aus Rohrzucker entsteht. Dieses Polysaccharid ist aus Glucose zusammengesetzt und enthält 90% α - 1,6 - glycosidische Bindung, nur eine geringe Zahl 1,3 - Verknüpfungen. Seine Wasserlöslichkeit läßt sich durch die große Zahl der Hydroxylgruppen erklären. Läßt man eine alkalische Dextranlösung mit Epichlorhydrin reagieren, kommt es zur Erstarrung unter Wärmeabgabe. Die Reaktion läuft folgendermaßen ab: Die löslichen Polymerketten werden durch Glycerinäther-Brücken verbunden, wobei das Epichlorhydrin mit zwei Hydroxylgruppen aus verschiedenen Ketten in Verbindung tritt. Wichtig für die Gelherstellung ist, von welchen Faktoren die Beschaffenheit des Gels abhängt. Beim Dextrangel nimmt das Quellvermögen zu, wenn die Konzentration, bzw. das Molekulargewicht abnimmt, oder die Epichlorhydrinmenge verringert wird.

2. Polyacrylamidgele:

Acrylsäure ($\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{CO} - \text{NH}_2$) ist eine wasserlösliche Substanz mit einer reaktiven Doppelbindung. Bei der Polymerisation erhält man das lösliche Polyacrylamid, das, wenn zur Polymerisation N,N' - Methylenbisacrylamid

$(\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{CO} - \text{NH} - \text{CH}_2 - \text{NH} - \text{CO} - \text{CH} = \text{CH}_2)$ beige-fügt wurde, zu einem wasserunlöslichen Gel erstarrt. Hierbei entsteht ein dreidimensionales Netzwerk. Die an jedem zweiten Kohlenstoffatom erscheinende Carbonsäureamid-Gruppe bedingt die Polarität und somit das Quellverhalten in Wasser. Für die radikalische Polymerisation kann Licht und Riboflavin oder Ammoniumpersulfat und β - Dimethylaminopropionitril als Redox-Katalysator verwendet werden. Auch in diesem Fall hängt die Porengröße des Gels von der Gesamtkonzentration an Monomer ab, aber auch von dem Anteil an bifunktionellem Monomer. Bei hoher Vernetzer-Konzentration erhalten wir Gele größerer Porosität. Homogene Polyacrylamidgele finden ihre Anwendung in der elektrophoretischen Proteinauftrennung, granuliert hingegen werden für die Gelchromatographie im wässrigen Milieu herangezogen.

3. Agargele und Agarosegele:

Agar ist ein aus Rotalgen gewonnenes Polysaccharid, das in heißem Wasser löslich, in kaltem Zustand als steifes Gel vorliegt. Araki gibt zwei Komponenten der Agar an. Den Hauptbestandteil Agarose und das Agaropektin, mit den Carboxyl- und Sulfatresten. Bei der Elektrophorese stellt sich auf Grund der sauren Gruppen eine Elektroendosmose ein, bei der Gelchromatographie tritt eine

erhebliche Absorption auf.

Agarose ist ein lineares Polysaccharid aus D-Galaktose und 3,6 - Anhydro-L-Galaktose. Es besitzt keine ionisierbaren Gruppen mehr und ist hiermit für die Gelchromatographie gut geeignet. Umständlich ist nur die Gewinnung der Agarose aus Agar, die heute entweder unter Benützung von Cetylpyridiniumchlorid, das die sauren Gruppen auffüllt, gewonnen oder durch mehrmalige fraktionierte Fällung mit konzentrierter Polyäthylenglykollösung extrahiert wird. Das Ergebnis ist dasselbe, nämlich ein Stoff frei von geladenen Teilchen. Suspensionen granulierter Agarose sind im Handel erhältlich. Um gleichmäßig runde Gelpartikelchen zu bekommen, wird unter Zusatz von Stabilisatoren und unter geeigneten Rührbedingungen bei 50 °C eine Agaroselösung in einem Gemisch aus Benzol und Toluol in Form von sehr regelmäßigen Kugeln auspendiert. Kühlt man ab, entstehen Gelkugeln, die je nach Kohlenhydratkonzentration, verschiedenartige Säulenmaterialie ergeben. Die Wahl, ob man Agar oder Agarose verwendet, richtet sich ausschließlich nach der zu trennenden Substanz. Die Anwendung dieser Gele ist nicht möglich bei Verwendung von Wasserstoffbrücken sprengenden Elutionsmitteln oder erhöhter Temperatur, da hier das Gel schmilzt. Auch Bakterienwachstum im Gel führt zur Unbrauchbarkeit.

Organophile Gelherstellung:

1. Sephadex-Derivate:

Hydrophile Sephadex-Typen zeigen ein Quellvermögen entsprechend dem Substitutionsgrad auch in polaren organischen Lösungsmitteln. Durch Acylierung oder Alkylierung der freien Hydroxylgruppen des Dextrangels erhalten wir Derivate, die gut in organischen Lösungsmitteln quellen und analog ihres Substitutionsgrades unterschiedliche Trennungseigenschaften besitzen.

2. Acrylgele:

Wasserlösliche Acrylamide ergeben, wie schon gehört, bei der Copolymerisation hydrophile Gele. Acrylsäurederivate lassen sich leicht in lipophile Gele überführen, die sogenannten Xerogele. Das Xerogel quillt in Benzol und Chloroform nur mäßig. Gelperlen erhält man bei der Polymerisation in Suspension, stark poröse Polymerisate bei Anwendung von Äthylenglykoldimethacrylat und sehr konzentrierter Lösung in Isoamylalkohol. Dieses stark poröse Polymer ist gut in Benzol quellbar. Vielleicht handelt es sich in diesem Fall um eine heterogene Gelstruktur.

3. Polystyrolgele:

Als Grundlage auf dem Gebiet der Ionenaustauscher haben die Polyesterole seit Jahrzehnten ihren festen Platz. Auf Grund der geringen Porosität und des hohen Absorptions-

und Verteilungseffektes versprochen sie eine gute Anwendbarkeit für die Gelchromatographie. Gute Ergebnisse erzielte man mit dem Styrol-Divinylbenzol-Polymerisat, bei der Trennung auf dem Lipidgebiet. Moore fand ähnliche Zusammenhänge für die Porosität wie für die schon erwähnten Gele. Die Polyesterolgele bieten den Vorteil, daß ihre Porosität mit Variationen des Lösungsmittels relativ konstant bleibt, also hiermit ein guter Wechsel der Elutionsmittel für die Säule möglich ist. Geringe Schrumpfung beim Trocknen tritt auf.

4. Aerogele:

Bei den Aerogelen handelt es sich um nicht quellbare Substanzen, die zur Substanzauftrennung von Makromolekülen in einem wählbaren Lösungsmittel herangezogen werden. Als Stoffe stehen uns Glasperlen verschiedener Größe bis hin zum Glaspulver zur Verfügung.

Ähnliche Vorstellungen hegt man im Zusammenhang mit dem Kieselgel, das zur Trennung inerter Polymere in organischen Lösungen sehr geeignet ist. Der große Vorteil liegt darin, daß das Porenvolumen variiert werden kann und eine gezielte Auftrennung möglich ist. Das Streben bei der Suche nach Materialien für die Gelchromatographie ist es, Stoffe zu finden, die eine definierte, poröse, inerte, starre und vielseitig verwendbare Struktur aufweisen.

Handelsübliche Gele:

1. Sephadex:

Sephadex, ein Dextrangel, wird in acht verschiedenen Typen mit unterschiedlichen Quellvermögen vom Handel angeboten. Die Porosität bestimmt den Fraktionierungsbereich. Bei den zwei Typen G-25 und G-50 finden wir eine Aufgliederung in je drei Gruppen, und zwar gemäß der Korngröße fein, mittel und grob. Bei fein und mittel, die im Regelfall verwendet werden, bekommen wir eine scharfe Auftrennung. Die grobe Körnung ist speziell für die Zentrifugentechnik und für die Chromatographie mit hoher Durchflußgeschwindigkeit gedacht. Wichtig für die Handhabung ist, das Einhalten der vorgeschriebenen Quellzeiten. Sephadex ist stabil gegen Laugen und schwache Säuren. Starke Oxydationsmittel und bei älteren Säulen Mikroorganismenansiedlung führen zur Unbrauchbarkeit. Eine Aufbewahrung des Gels ist gequollen, wie auch getrocknet, möglich. Vor der Aufbewahrung ist eine Reinigung der Säule mit Wasser nötig. Durch mehrmaliges Waschen mit Äthanol (50%, 99%) kann das ganze Wasser entfernt und der Trockenzustand erreicht werden. Mit abweichendem Quellungsgrad kann man, auch in Dimethylsulfoxyd, Glykol und Formamid Sephadex-G-Typen quellen lassen. Einen weiteren Sephadexvertreter erhalten wir durch Alkylierung von Sephadex

G-25. Das so gewonnene Sephadex LH - 20 hat die Besonderheit in Wasser, Äthanol und Chloroform annähernd das gleiche Quellverhalten zu zeigen.

2. Bio-Gel:

Unter der Bezeichnung Bio-Gel versteht man vernetzte Polyacrylamide, die als perlenförmige Partikel im Handel erhältlich sind. Elf Typen mit unterschiedlichem Wasseraufnahmevermögen werden geliefert. Die Quellzeiten variieren von 30 Minuten für Typ P - 2, bis zu 24 Stunden, für Typ P - 300. Stabiles Verhalten finden wir von pH 2 bis pH 11. Für längere Arbeiten über pH 9 ist es nicht geeignet. Durch höhere Hydroxylionen-Konzentration kommt es zur Hydrolyse der Carbonamid-Bindung und somit erhält das Gel Ionenaustauschcharakter. Geringe Anzahl von Carboxylgruppen liegt schon im frischen Gel vor, die bei salzhaltigen Elutionsmitteln keine Bedeutung haben. Mikroorganismenbefall kommt, da es sich um einen Kunststoff handelt, nicht vor.

3. Agarose:

Agarosegele für Gelchromatographie werden im Unterschied zu den beiden anderen Gelen bereits im gequollenen Zustand geliefert. Wenige Erfahrungsberichte über die Trennungsbereiche der einzelnen Typen liegen bisher vor. Es scheint jedoch von Vorteil für die Trennung von Viren, Phagen, Zellpartikelchen und Bakterien zu sein. Grundsätzlich muß

diesen Gelen, 0,02% Natriumazid zugesetzt werden, um das Bakterienwachstum zu verhindern.

4. Styragel:

Ganz besondere Eigenschaften besitzt das Styragel, das Polymerisat aus Styrol und Divinylbenzol. Die kaum gequollenen Perlen werden in Diäthylbenzol geliefert. Folgende Elutionsmittel stehen zur Verfügung: Tetrahydrofuran, Trichlorbenzol, o - Dichlorbenzol, Toluol, m - kresol, Methylenchlorid und Dimethylformamid. Polare Lösungsmittel werden nicht empfohlen. Die handelsübliche Korngröße liegt zwischen 40 und 80 μ .

Experimenteller Teil:

Diskelektrophoretische Auftrennung von Normalsekreten:

1. Durchführung:

a) Gelherstellung:

Die diskelektrophoretische Auftrennung erfolgt in einem 7,5%igen Acrylamid-Mittelporgel mit einem pH-Wert von 8,8 nach der von Maurer angegebenen Methode. (Auftrennungsoptimum = 10^4 - 10^6).

Das Gel wurde nach folgendem Rezept hergestellt:

Lösung 1: 1n HCl	480ml
Tris (-Hydroxymethyl-aminomethan)	366g
Temed	0,23ml
Aqua dest.	ad 1000ml

Lösung 2: Acrylamid	300g
Bisacrylamid	28,8g
Aqua dest.	ad 1000ml

Lösung 3: Ammoniumperoxodisulfat	60mg
Aqua dest.	ad 100ml

Zur Polymerisation des Gels wurden diese Lösungen

wie folgt gemischt: $H_2O : L_1 : L_2 : L_3 = 1:1:2:4$.

Dieses so erhaltene Gemisch wird in einseitig verstopfte standardisierte Glasröhrchen gefüllt. Anschließend läßt man das Sol unter Luftabschluß durch Überschichtung von Wasser 1 Stunde polymerisieren.

b) Puffersystem:

Als Elektrodenpuffer für die Diskelektrophorese wurde ein Trisglycinpuffer mit einem pH-Wert von 8,4 verwendet. Nach folgendem Rezept wurde er hergestellt:

Tris 6g

Glycin 28,8g

Aqua dest. ad 1000ml

Der so erhaltene Puffer wurde in einer dunklen Glasflasche unter Kühlung aufbewahrt. Der Elektrodenpuffer wurde durch Verdünnen mit Aqua dest. auf das zehnfache gewonnen. Der pH-Wert des Puffers wurde vor und nach dem Diskelektrophoreselauf kontrolliert. Da sich der pH-Wert des Kathodenpuffers nach dem Lauf von 8,3 auf etwa 10 erhöhte, und der pH-Wert des Anodenpuffers auf etwa 6 sank, mußte der Puffer nach jedem Lauf gewechselt werden, um gleiche Bedingungen zu bekommen.

c) Versuchsaufbau:

Die 16 Gelröhrchen wurden in die Halterungen der oberen Diskelektrophoresekammer eingesetzt. Die beiden getrennten Kammern wurden mit einem Trisglycinpuffer gefüllt. Die obere und die untere Kammer standen nach Zusammensetzen des Apparates nur über die Gelröhrchen in Kontakt. Um die Laufgrenze sichtbar zu machen, fügte man dem oberen Puffer eine kleine Menge Thymolblau bei. Nun wurde das Sekret mit einer Spritze in jedes Glasröhrchen vorsichtig über der Geloberfläche unter den Elektronenpuffer geschichtet und zwar für die Coomassie-Brilliant-Blue-Färbung 0,1 ml für die Glyco- und Phosphorprotein-färbung 0,3 ml Sekret. Nach dem Anschließen der Elektroden startete der Vorlauf mit 32mA über 10 Minuten, dann schloß sich der Hauptlauf mit 80mA über 60 Minuten an. Nach Abschluß der elektrophoretischen Auftrennungen wurden die Gele aus den Glasröhrchen entfernt. Anschließend wurden die Färbungen durchgeführt.

d) Färbungen:

1.) Coomassie-Brilliant-Blue-Färbung:

Zur unspezifischen Färbung der Proteine des Parotis- und Submandibularissekretes nach der elektrophoretischen Auftrennung wurde die Coomassie-Brilliant-Blue-Färbung durchgeführt. Die Gele wurden zunächst zur Denaturierung der Eiweißstoffe 1 Stunde in 12,5%iger Trichloressigsäure geschüttelt. Daran schloß sich der eigentliche Färbevorgang. Die 1%ige wässrige Stammlösung des Coomassie-Brilliant-Blue-Farbstoffes wird 1 : 19 mit der 100%igen Trichloressigsäure versetzt. In dieser Lösung werden die Gele 24 Stunden gefärbt. Anschließend wird in 7%iger Essigsäure unter Rühren der Farbüberschuß entfernt. Die gefärbten Gele können in 7%iger Essigsäure aufbewahrt werden.

Zur Differenzierung der einzelnen Proteine werden weitere Spezialfärbungen durchgeführt.

2.) Glycoproteinfärbung:

Um die Glycoproteine zu charakterisieren, standen die Färbungen nach Caldwell und Pigman, Clarke, Keyser und Zacharius zur Verfügung. Die modifizierte Methode nach Zacharius erwies sich als die zuverlässigste. Sie läuft nach folgendem Rezept ab:

1. 30 Min. schütteln in 10%iger Trichloressigsäure zur Fixierung
2. Abspülen mit Aqua dest.
3. 40 Min. in 1%iger Perjodsäure, gelöst in 3%iger Essigsäure, stehen lassen,
4. über Nacht mit einigen Wechseln in Aqua dest. waschen
5. 50 Min. in Schiffschem Reagenz ins Dunkle stellen
6. 3 mal 15 Min. in 0,5%igem Metabisulfit waschen
7. unter mehrmaligem Wechseln und über Nacht in Aqua dest. waschen
8. in 7%iger Essigsäure aufbewahren
Die Glycoproteine haben sich hierbei rot angefärbt.

3.) Phosphoproteinfärbung:

Zur Bestimmung der Phosphoproteine wurde nach dem Rezept von Cutting und Roth angefärbt:

1. 12 h in 10%iger Sulfosalicylsäure (SSA)
2. 70 Min. in 10%iger SSA und 0,5 m CaCl_2 (Hydrat)
3. mit Aqua dest. abspülen
4. 30 Min. in 0,5 n NaOH-Lösung bei 60 °C
5. a) 10 Min. in 1%iger wässriger Ammoniummolybdatlösung
b) 10 Min. in 1%iger " "
6. 30 Min. in 1%igem Ammoniummolybdat gelöst in 1n HNO_3
7. 30 Min. in 0,5%igem Methylgrün gelöst in 7%iger Essigsäure
8. Farbüberschuß in 10%iger SSA entfernen, mehrmals wechseln,
9. in 7%iger Essigsäure aufbewahren

2. Ergebnisse:

Die oben beschriebene diskelektrophoretische Auftrennung kann grundsätzlich mit jedem Sekret, ob normal oder pathologisch von der Glandula parotis oder der Glandula submandibularis ect. durchgeführt werden und die drei beschriebenen Färbeverfahren können angeschlossen werden. Wird das Sekret eines Normalprobanden sowohl der Glandula parotis als auch der Glandula submandibularis genommen, ergeben sich zwei Bandenmuster. Die Coomassie-Brilliant-Blue-Färbung der beiden Sekrete weisen analoge Bandenmuster auf. Zusätzlich der in der Abb. 1 gefundenen, bekannten Banden des Parotissekretes findet man beim Submandibularissekret vier weitere Banden, g_1 , h_1 , k , l , (siehe Abb. 2). Wird für beide Sekrete die Glycoproteinfärbung durchgeführt, so färben sich beim Parotisnormalsekret die Banden, a , b , c_1 , c , d_1 , d_4 und e , rot an, zusätzlich erhalten wir bei dem Submandibularissekret eine Rotfärbung der Banden g_1 und l . Bei der Durchführung der Phosphoproteinfärbung färben sich die Banden f , g , i , j , grün an, zusätzlich zu diesen kommt beim Submandibularissekret die Bande k hinzu. Diese zwei Färbeverfahren ermöglichen eine grobe Zuordnung nach Glyco- und Phosphoproteinen, was als Glied in der Kette von Versuchen für die Zuordnung und Identifizierung der Banden dienen soll.

Säulenchromatographische Auftrennung mit anschließender diskelektrophoretischer Auftrennung:

Eine weitere Möglichkeit um der Zuordnung und Identifizierung der Banden näher zu kommen, stellt die Gelchromatographie mit handelsüblichen Säulen dar, die eine etwaige molekulare Zuordnung der Banden ermöglicht. Wir testeten zwei verschiedene Gelgruppen an Hand zweier für uns geeigneter Geltypen:

1.) Das Dextrangel Sephadex G-100 und G-200 mit einem Trennbereich für Proteine von 5000-150000 M und 5000-80000 M.

2.) Das Polyacrylamidgel Bio-Gel P-100 und P-150 mit einem Trennbereich für Proteine von 5000-100000 M und 15000-150000 M.

Bei annähernd gleichwertigen Ergebnissen wählten wir das Bio-Gel P-100 für unsere weiteren Versuche. Die Herstellung der Säule geschieht darin, daß das vom Handel gelieferte Perlpolimerisat außerhalb der Säule mit dem Puffer für die Fraktion quillt. Die Quellzeit für das verwendete Bio-Gel P-100 beträgt ca. 20 Stunden. Nun wird das Gel in die Säule (Maße 9 mm x 1300 mm) gefüllt. Die so entstandene Säule wird in die Versuchsanordnung, bestehend aus einem Reservoirbehälter für das Eluat, einer Pumpe, die das Eluat auf die Säule tropfen läßt, und der

Säule selbst, die die Auftrennung der aufgebrauchten Substanz bewirkt, eingebracht. Ein Photometer liefert uns über einen Schreiber eine Extinktionskurve der Konzentrationen der durchlaufenden Moleküle (Wellenlänge 253 m). Am Ende dieser Anordnung steht der Fraktiomat, der uns die halbstündigen Fraktionen in Reagenzgläsern sammelt. Ist die Versuchsanordnung für den Versuch bereit, wird das vom Normalprobanden gewonnene Sekret lyophilisiert. 50 mg des Lyophilisates werden in 1 - 2 ml Kochsalzlösung gelöst. (0,02% Natriumazid). Die so erhaltene Lösung wird auf die Säule aufgetragen. Nun läßt man die Substanz einsickern. Das Elutionsmittel, die gleiche Substanz wie das oben verwendete Lösungsmittel für das Lyophilisat, tropft langsam auf die Säule: die Auftrennung beginnt. Die großen Moleküle passieren zuerst den Photometer und erscheinen in den ersten gewählten halbstündigen Fraktionen, die kleinsten erscheinen in den letzten Fraktionen. Gemäß dem Säulenvolumen von ca. 80 ml und einem Fraktionsvolumen von 3 ml erhält man eine Laufzeit des Versuches von 26 Stunden. Die so gewonnenen Fraktionen werden diskelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend den drei Färbeverfahren unterzogen. Anhand mehrerer Läufe und unter Berücksichtigung der vom Photometer gewonnenen Kurve wurden nur die Fraktionen 12 bis 38 zur Auswertung herangezogen, da alle zu

erwartenden Banden in diesen Fraktionen auftreten.

Dieser Versuchsablauf wurde für das Parotis- und Submandibularissekret von Normalprobanden durchgeführt. Die Gele der einzelnen Fraktionen wurden aneinandergereiht und photographisch dokumentiert. Schematische Darstellungen der photographisch gewonnenen Bilder stellen Abb. 3 und 7 dar, die dazugehörigen Kurven sieht man in Abb. 6 und 10. Abb. 4 und 5, 8 und 9 zeigen die analogen Bilder für die beiden Spezialfärbungen. Entsprechend der Molekulargewichtsabstufung bekommen wir beim Parotissekret die Banden a, b, c₁, c am Anfang mit dem höchsten Molekulargewicht, es folgen die Banden e₁, e, f, g, h, dann die Bandengruppe d₁ - d₄ und am Schluß die Banden i und j. Beim Submandibularissekret erhalten wir analoge Verhältnisse: die vier zusätzlichen Banden erscheinen wie folgt: Die Banden g₁, h₁ liegen im Bereich der Banden e₁, e, f, g, h und die Banden k und l liegen am Anfang des Bereichs der Banden i und j, und etwas davor.

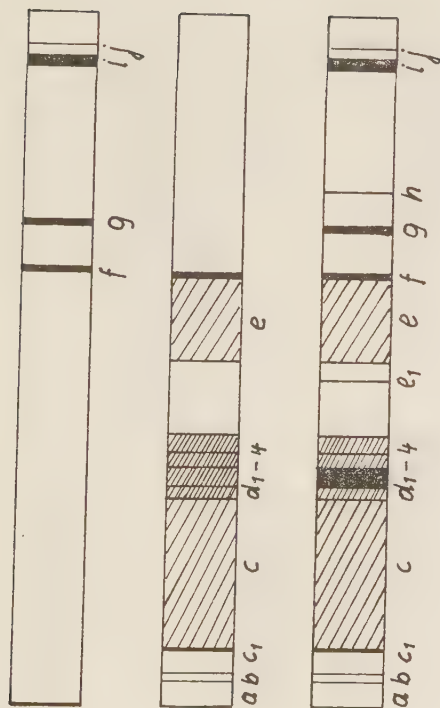


Abb. 1 Schematische Darstellung der Bandenmuster des Sekretes der Glandula parotis in den drei Spezialfärbungen: Coomassie-Brilliant-Blue-, Glycoprotein- und Phosphoprotein-färbung (von unten nach oben)

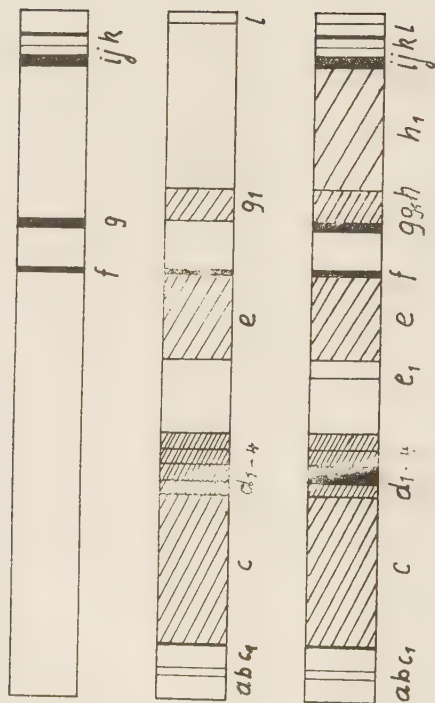


Abb. 2 Schematische Darstellung der Bandenmuster des Sekretes der Glandula Submandibularis in den drei Spezialfärbungen: Coomassie-Brilliant-Blue-, Glycoprotein- und phosphoproteininfärbung (von unten nach oben)

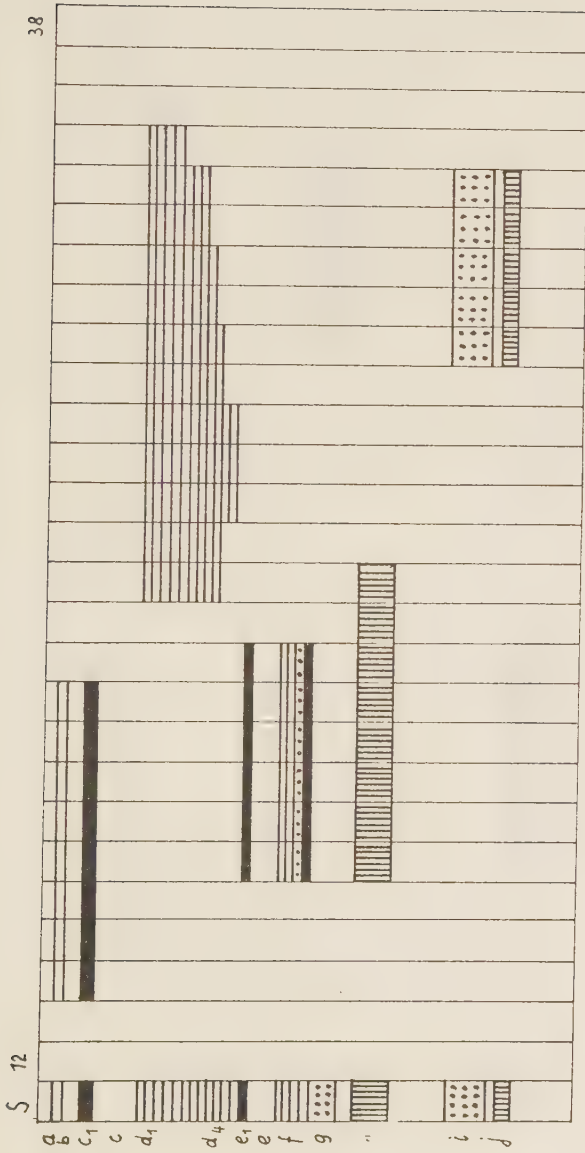


Abb. 3 Schematische Darstellung der säulenchromatographischen Auftrennung und anschließender disklektrophoretischer Auftrennung des Sekretes der Glandula Parotis in der unspezifischen Coomassie-Brilliant-Blue-Färbung

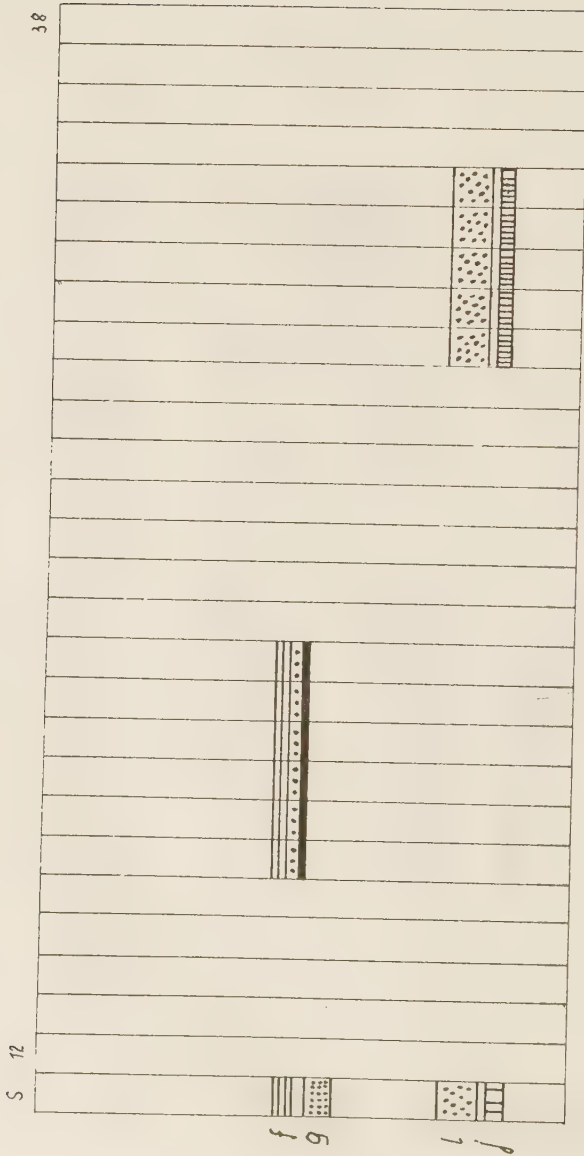


Abb. 4 Schematische Darstellung der säulenchromatographischen Auftrennung und anschließender disklektrophoretischer Auftrennung des Sekretes der Glandula Parotis in der spezifischen Phosphoproteinfärbung

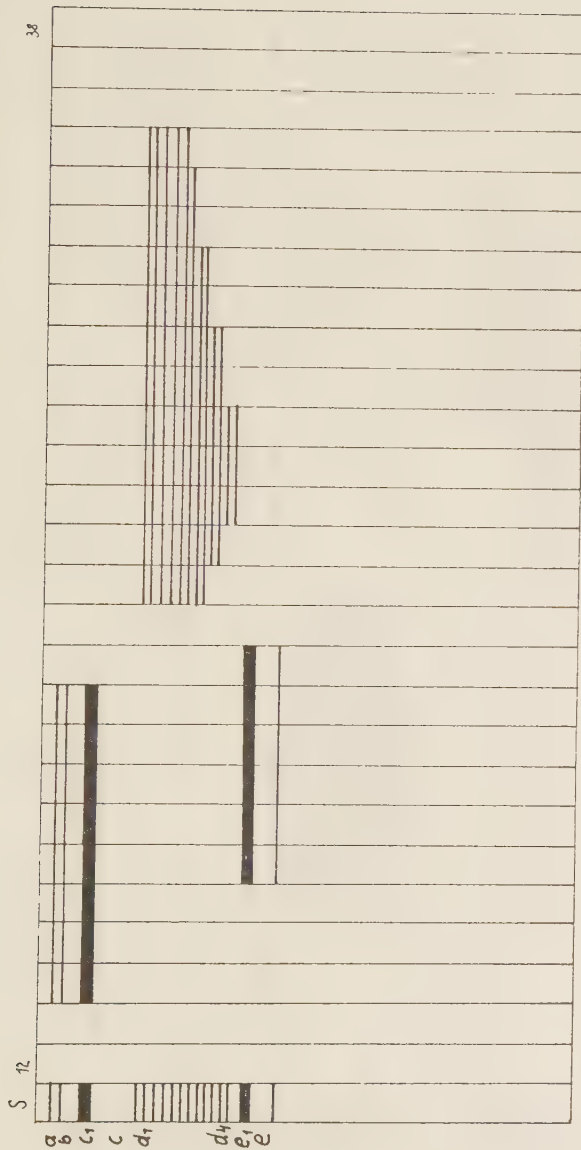


Abb. 5 Schematische Darstellung der säulenchromatographischen Auftrennung und anschließender diskoelektrophoretischer Auftrennung des Sekretes der Glandula Parotis in der spezifischen Glycoproteinfärbung

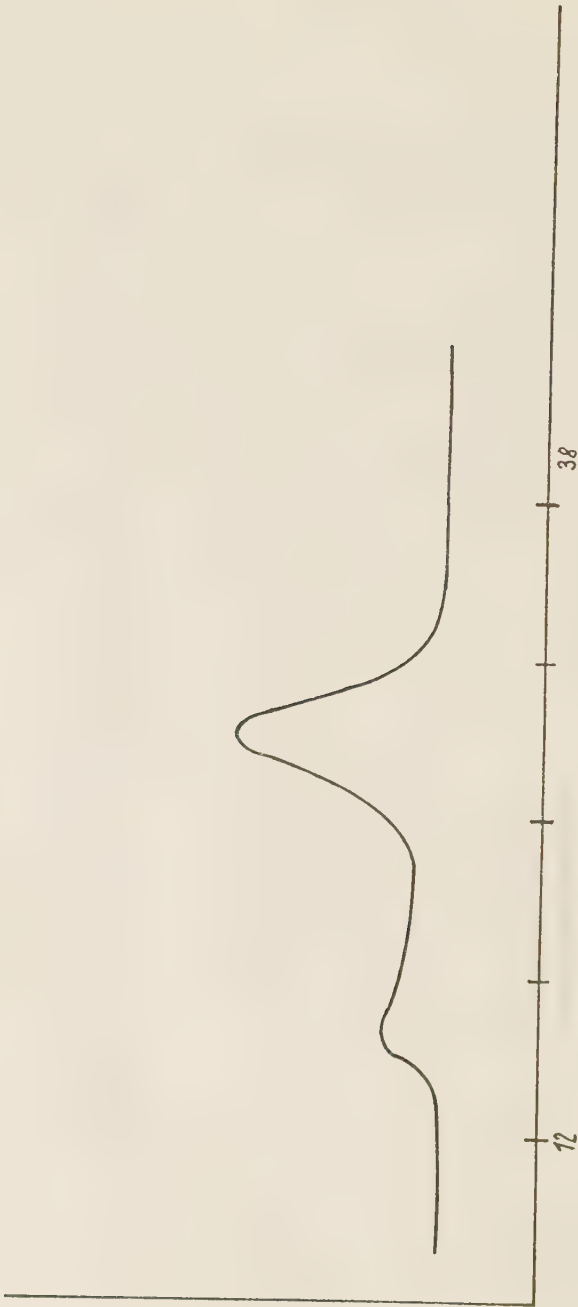


Abb. 6 Extinktionskurve der Fraktionen des Sekretes der Glandula parotis

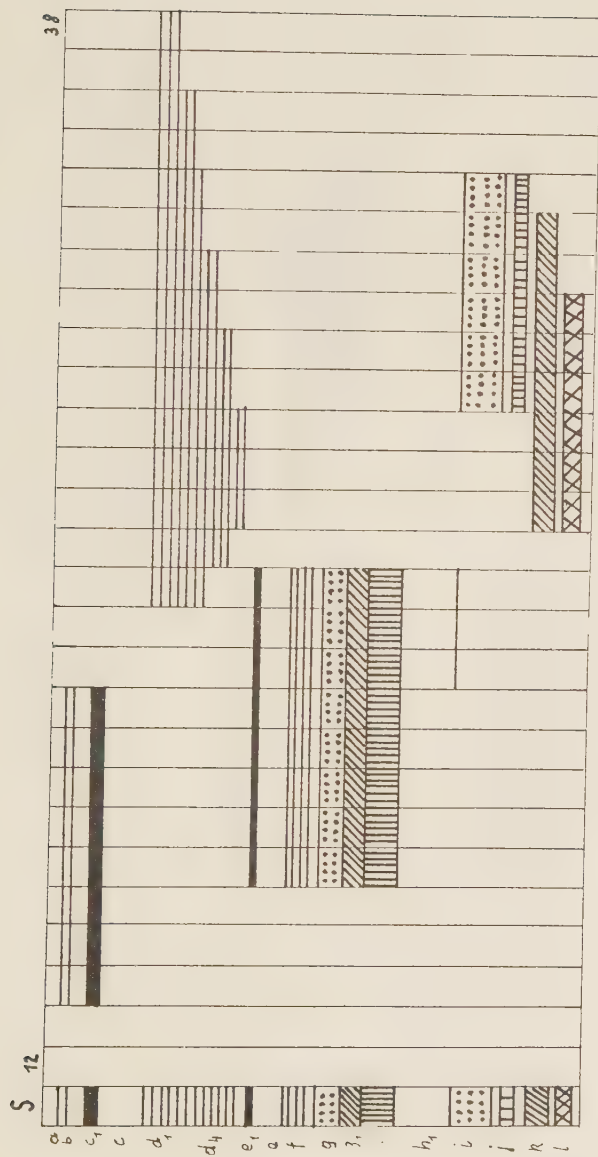


Abb. 7 Schematische Darstellung der säulenchromatographischen Auftrennung und anschließender disklektrophoretischer Auftrennung des Sekretes der Glandula Submandibularis in der unspezifischen Coomassie-Brilliant-Blue-Färbung

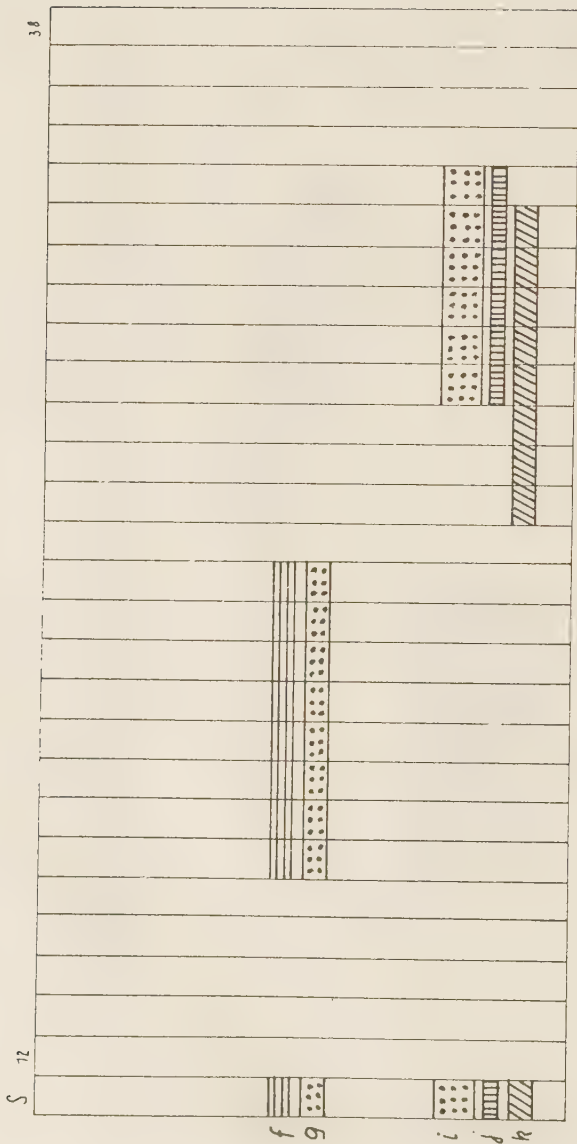


Abb. 8 Schematische Darstellung der säulenchromatographischen Auftrennung und anschließender disklektrophoretischer Auftrennung des Sekretes der Glandula Submandibularis in der spezifischen Phosphoproteinfärbung

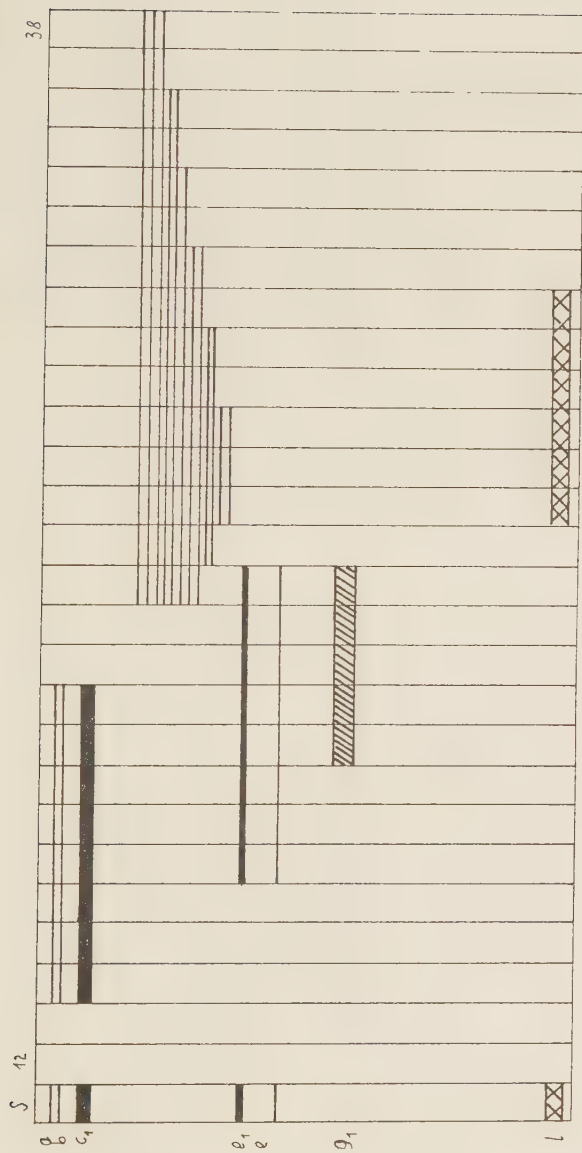


Abb. 9 Schematische Darstellung der säulenchromatographischen Auftrennung und anschließender disklektrophoretischer Auftrennung des Sekretes der Glandula Submandibularis in der spezifischen Glycoproteinfärbung

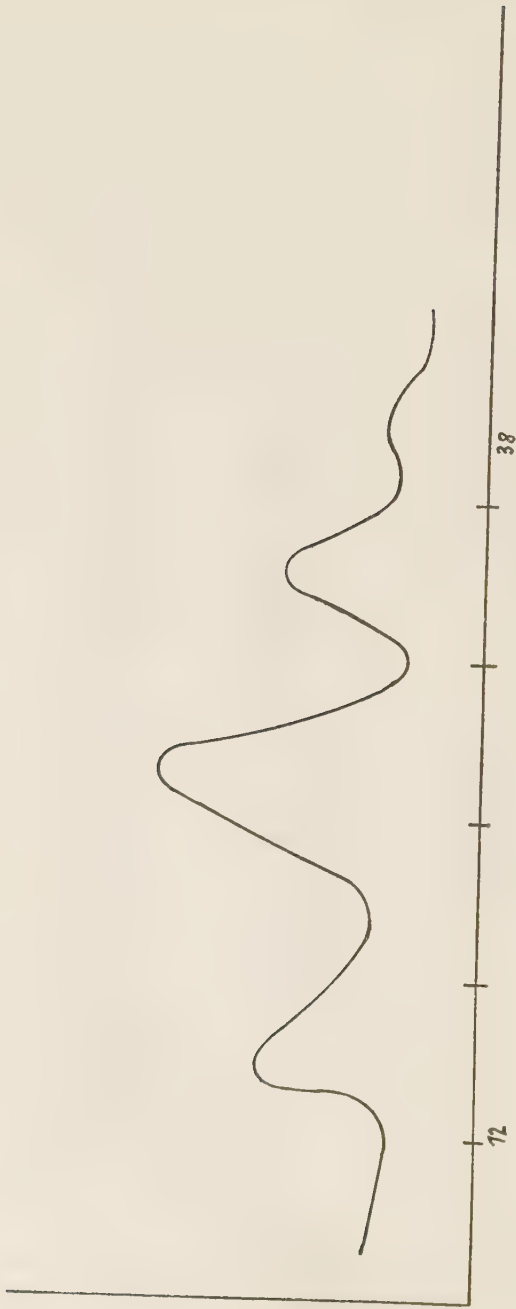


Abb. 10 Extinktionskurve der Fraktionen des Sekretes der Glandula Submandibularis

Diskussion:

Die Diagnostik der Parotis und Submandibulärerkrankungen wird vorwiegend durch die klinischen Beschwerden, Schmerz, Schwellung, Rötung und eingeschränktem Speichelfluß bestimmt. Neben einer histologischen Untersuchung und der Speicheldrüsenszintigraphie steht heute die Sialographie und die Funktionsszintigraphie im Vordergrund der Diagnosesicherung. In einer Reihe von Arbeiten, die die diskelektrographische Veränderung der Drüsensekrete als diagnostische Hilfsmittel zum Inhalt hatten, interessierte einmal die Veränderung der Sekretzusammensetzung, z.B. bei akuter und chronischer Parotitis, bei benignen und malignen Tumoren ect., zum anderen aber auch die Zuordnung bestimmter Banden zu bestimmten Stoffgruppen.

Nach bisherigen Untersuchungen gilt, daß es sich bei den Banden a, b, c₁, c, um Immunglobuline, Blutgruppensubstanzen und drüsenspezifische Proteine handelt, die Banden d₁ bis d₄ entsprechen der Amylase, die Bande h dem Albumin. Zwei Verfahren zur Identifizierung und groben Einteilung der übrigen Banden werden in dieser Arbeit angewandt. Zum einen die diskelektrophoretische Auftrennung mit anschließenden Spezialfärbungen (Coomassie-Brilliant-Blue-Glycoprotein- und Phosphoproteinfärbung), zum anderen die Säulenchromatographieauftrennung der Sekrete und anschließenden

de diskelektrophoretische Auftrennung mit Färbung.

Bei Vergleich der Bandenmuster des Parotis- und Submandibularsekretes stellt sich heraus, daß beim Submandibularsekret vier weitere Banden zu den bekannten Banden der Parotis (a, b, c₁, c, d₁₋₄, e₁, e, f, g, h, i, j,) hinzukommen, nämlich g₁, h₁, k, l. Die Glycoproteinfärbung zeigt, daß es sich bei den Banden a, b, c₁, c, d₁₋₄, e, der Parotis um Glycoproteine handelt und zwei zusätzliche Glycoproteine der Submandibularis g₁ und l.

Als Phosphoproteine erweisen sich die Banden f, g, j, i, beim Parotissekret und beim Submandibularsekret zusätzlich die Bande k. Schon Bekanntes deckt sich mit dem hier gefundenen.

Die Säulenchromatische Auftrennung an der Bio-Gel P-100-Säule mit einem Trennbereich von 5000 - 100000 M erlaubt eine grobe Zuordnung der Banden. Folgende Molekulargewichtstabufung beim Parotissekret ergab sich: Banden a, b, c₁, c, mit ca. 80000 M und größer; Banden e₁, e, f, g, h, mit ca. 80000 - 30000 M Bande d₁₋₄, mit ca. 30000 - 10000 M; Banden i, j, mit ca. 20000 - 5000 M. Analoge Verhältnisse ergaben sich für das Submandibularsekret, wobei die Banden g₁, h₁, im Bereich von ca. 40000 - 30000 M, die Banden k, l, im Bereich von ca. 30000 - 10000 M liegen. Eine Stofftrennung auf säulenchromatographischem Wege ist

nicht möglich, da sich die Banden überschneiden, also in den Fraktionen Stoffgemische vorliegen. Als Unterschied zwischen dem Sekret der Glandula Parotis und der Glandula Submandibularis stellt ausser dem schon genannten noch zusätzlich heraus, daß die Amylasebande d_{1-4} sich bei der Parotis über 10 Fraktionen verteilt, bei der Submandibularis über 20 Fraktionen. Es besteht einmal die Möglichkeit, daß es sich um 2 verschiedene Stoffe handelt oder um zwei Amylasen verschiedener Struktur.

Diese grobe Einteilung soll nur als ein Glied in einer Versuchsreihe verstanden werden und zur Überprüfung neuer Ergebnisse dienen.

Zusammenfassung:

Bei der diskelektrophoretischen Auftrennung von menschlichen Parotis- und Submandibularissekreten wurden verschiedene Proteinmuster gefunden. Im Submandibularissekret fanden sich vier zusätzliche Banden im anodennahen Gelbereich.

Zur Identifizierung der einzelnen Proteinbanden wurden in der vorliegenden Arbeit neben der säulenchromatographischen Auftrennung des Eluats, auch spezielle Glyko- und Phosphoproteinfärbungen durchgeführt und mit dem Nativsekret der beiden Speicheldrüsen verglichen. Die Glykoproteine lagen im kathodennahen Gelbereich bei einem Molekulargewicht von 80000 - 30000 M und größer. Die Phosphoproteine zeigten sich im anodennahen Gelbereich bei einem Molekulargewicht von 80000 - 5000 M. Für das säulenchromatographische Verfahren standen zwei Trenngele zur Verfügung, das Dextrangel Sephadex G-100 und das Polyacrylamidgel Bio- Gel P - 100.

Bio-Gel P-100 brachte die besseren Trennergebnisse und wurde deshalb für die Versuchsreihe verwendet.

Eine Zuordnung der einzelnen Eiweißfraktionen zu bestimmten Molekulargewichtsbereichen wurde möglich.

Literaturverzeichnis

- Albegger, K.W., O.Müller: Der tagesrhythmische Sekretionszyklus der Glandula Submandibularis der Ratte. Arch. klin.exp. Ohr - Nas.u.Kehlk.-Heilk. 204 (1973) 27.
- Benedik-Spät, E.: The composition of unstimulated human parotid saliva, Arch.oral.Biol. 18 (1973) 39
- Benedik-Spät, E.: The composition of human stimulated saliva, Arch.oral.Biol. 18 (1973) 1091
- Dawes, C.B.Y.Ong: Circadian rhythmus in the concentrations of protein and the main elektrolytes in human unstimulated parotid saliva. Arch.oral.Biol. 18 (1973) 1233
- Determann, H.: Gel Chromatography, Second Edition Gel Filtration - Gel Permeation - Molecular Sieves, A Laboratory Handbook, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg - New York 1969
- Maurer, H.R.: Diskelektrophorese, De Gruyter, Berlin (1968)
- Mayo, J.W., D.M.Carlson: Protein composition of human submandibular sekretions. Arch.Bioch. Biophys. 161 (1974) 134
- Rauch, S.: Die Speicheldrüsen des Menschen. Thieme, Stuttgart 1959

- Shannon, I.L., R.P.Suddick: Effekts of light and darkness on human parotid salivary flowrate and chemical composition. Arch.oral.Biol. 18 (1973) 601
- Shurk, A. u.a.: Methoden der quantitativen Eiweißbestimmung im menschlichen Parotisspeichel. Acta otorhi rhinolaryng. 71 (1971) 71
- Smith, Q.T. u.A.: Polyacrylamid gel slab elektrophoresis of human salivary proteins. Arch.oral.Biol 13 (1974) 407
- Smithies, O.: Biochem.J.61 (1955) 629
- Steiner, I.C., P.J.Keller: An electrophoretic analysis of the protein components of human parotid saliva. Arch.oral.Biol. 13 (1968) 1213
- Wolf, R.O., L.L.Taylor: A comparative study of saliva protein analysis. Arch.oral.Biol.9 (1964) 135
- Zippel, R., u.a.: Zur Elektrophorese des Parotissekretes. I.Mitteilung.Z.Laryng.Rhinol.47 (1968) 500
- Zippel, R. u.a.: Zur Elektrophorese des Parotissekretes II.Mitteilung - Membranfolienelektrophorese Z. Laryng.Rhinol.47 (1968) 891

L e b e n s l a u f

Am 1. März 1951 wurde ich in Obergünzburg, Kreis Marktoberdorf/Allgäu, geboren.

Nach insgesamt 14 Jahren Schulbesuch an der Volksschule und am nat. math. Gymnasium legte ich am 19. Juni 1971 das Abitur am Peter-Dörfler-Gymnasium in Marktoberdorf ab.

Im WS 1971/72 begann ich mein Studium mit Biologie, wechselte im SS 1972 auf Zahnmedizin über. Nach Anrechnung des 1. Semesters legte ich im SS 1972 das Vorphysikum und im WS 1973/74 das Physikum ab. Im SS 1977 schloß ich mein Studium mit dem Staatsexamen in Zahnmedizin ab.

